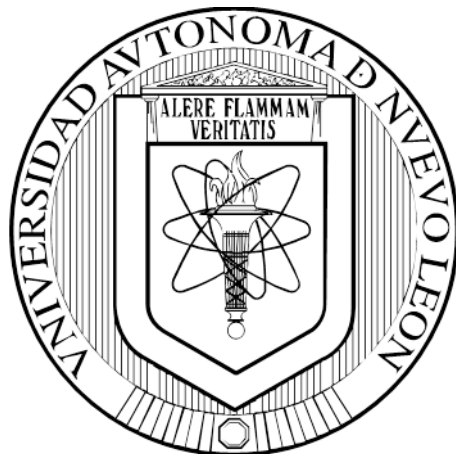


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA MEDIADA POR  
MACRÓFAGOS SENSIBILIZADOS CON ANTÍGENOS DE  
*TRICHINELLA SPIRALIS* EN UNA LÍNEA CELULAR DE  
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN”**

**POR**

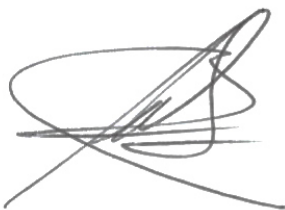
**Q.B.P. MARCOS MARTÍN DE JESÚS ARROYO GARZA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**DICIEMBRE, 2018**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA MEDIADA POR  
MACRÓFAGOS SENSIBILIZADOS CON ANTÍGENOS DE *TRICHINELLA*  
*SPIRALIS* EN UNA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE  
PULMÓN

Aprobación de la Tesis:



---

Dr. Romel Hernández Bello  
Director de Tesis



---

Dr. Alejandro Sánchez González  
Co-Director de Tesis



---

Dr. José Prisco Palma Nicolás  
Comisión de Tesis



---

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Sub-director de Estudios de Posgrado

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA MEDIADA POR  
MACRÓFAGOS SENSIBILIZADOS CON ANTÍGENOS DE  
*TRICHINELLA SPIRALIS* EN UNA LÍNEA CELULAR DE  
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN”

Presentado por: Q.B.P. Marcos Martín de Jesús Arroyo Garza

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología Molecular del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Romel Hernández Bello.



---

Dr. C. Romel Hernández Bello  
Director de Tesis

## **Dedicatoria**

Siempre he pensado que las personas estamos hechas de recuerdos y momentos que hemos compartido con las personas que llevamos siempre en nuestro corazón; y aunque esas personas ya no estén con nosotros, el solo recordar una palabra, un nombre, una sonrisa o un consejo nos hace tenerlos aquí presentes.

También he pensado que las personas que ya no están con nosotros no parten sin dejarnos antes una gran lección y de mi padre yo aprendí que no importa el momento por el que estemos pasando, nunca hay que darse por vencido y siempre tienes que dar lo mejor de ti.

**Dedicado al hombre que me dio la vida**

**Marcos Arroyo Cruz**

***“Cuando la noche haya llegado y la tierra esté oscura y la luna sea la única luz que veamos, no tendré miedo, mientras tu estés conmigo”***

**John Lennon – Stand by me**

*“A mi familia por su amor  
incondicional desde el inicio  
mi madre y su ternura  
mi padre y su sacrificio  
a quien ha hecho posible  
que yo siga aquí  
saltando al vacío cada día  
esto va por ti”*

**Nach – Anochece**

*“Aquellos que sueñan de día  
son conscientes de muchas cosas  
que escapan a los que sueñan  
solo de noche”*

**Edgar Allan Poe**

*“Dejé que la vida me enseñara  
a ser feliz  
dejé que la vida me enseñara  
lo que es ser real”*

**Vicente García – Dos y Siete**

## **Agradecimientos**

A la Dra. Gloria González por estar siempre al pendiente de mí tanto dentro como fuera de la facultad y por enseñarme que no importa el puesto que tengas siempre puedes ser una persona humilde.

A mi comisión de Tesis, el Dr. Romel Hernández Bello por tenerme paciencia estos 2 años y enseñarme a trabajar en el laboratorio de manera eficiente.

Al Dr. Alejandro Sánchez González por contagiarme siempre de su buen humor y actitud dentro y fuera del laboratorio y compartir sus conocimientos conmigo.

Al Dr. José Palma por enseñarme a planear detalladamente todos los experimentos que me proponga a realizar y hacer todo siempre a la brevedad posible.

A mis maestros: Dr. Rogelio Treviño, Dr. Miguel Becerril, Dr. Ángel Andrade, Dra. Alexandra Montoya, Dr. Hiram Villanueva, Dra. Mariana Elizondo por compartir sus conocimientos conmigo en sus respectivas materias y por crear un ambiente ameno siempre que convivimos.

A mi hermana la Q.F.B. Rebeca Sánchez por preocuparse siempre por mí y ponerme el ejemplo de cómo ser una buena persona, amable, sencilla y siempre sonriente.

A mi otra hermana la Q.F.B. Karen Méndez por siempre estar ahí cada que ocupé alguien que me escuchara y enseñarme a trabajar en silencio y dejar que mis resultados hicieran el ruido.

A mi madre adoptiva la M.C. Christian Campos por cuidar de nosotros a todas horas y por tener a alguien con quien pudiera ser siempre yo mismo, sincero y sencillo.

A mis compañeros del departamento: M.C. Luis Cortés, M.C. Orlando Flores, M.C. Fernando Espinosa, M.C. Carolina Luna, M.C. Vanesa Escalona, M.C. Martín González por convivir tanto dentro como fuera del departamento y ayudar a llevar la estancia en la maestría de una forma divertida.

Al M.C. Gerardo González por su invaluable ayuda en el laboratorio y ser un ejemplo de cómo ser un estudiante dedicado a la ciencia.

A mi compañero de laboratorio el Q.F.B. Gabriel Guerrero por hacer estos últimos meses muy amenos y siempre darme buenos consejos.

A los integrantes del CRCEI: Q.B.P. Mimí González, Q.B.P. Lizeth Pérez, Q.B.P. Jessica Pérez y Q.B.P. Niria Güereca por siempre estar dispuestas a platicar conmigo y hacer mis estancias en el laboratorio mucho más felices.

Al Q.B.P. Luis Rodríguez por mostrarme como se puede estar siempre de buen humor y trabajar de forma profesional al mismo tiempo y al Q.B.P. Francisco Ramos por ayudarme siempre en tiempos de necesidad en el laboratorio.

Al departamento de Morfología: M.C. David Martínez, M.C. Daniel Salas, M.C. Abigail Robles y la Dra. María de Jesús Loera por apoyarme cuando más lo necesité y por siempre estar dispuestos a brindarme su desinteresada ayuda con cultivo celular y además ser buenos amigos y compañeros.

A mi cuadro chico: L.B.G. José Luis Nava y Q.B.C. Jaudiel Salado por todas esas salidas, esas pláticas y esos consejos que sin duda nunca voy a olvidar y por estar siempre ahí cuando los necesité.

A mis amigos que hice durante mi estancia en el INCAN: Nadia Peña, Pedrito y todos los amigos que sin duda hicieron de mi estancia una muy bonita experiencia.

Al Q.B.P. Victor Cruz y a toda la familia Cruz Holguín que son ya parte de mi familia y siempre que los veo me reciben con una sonrisa y con las puertas abiertas de su casa y de su corazón.

A la M.C. Diana Rodríguez por ser un ejemplo de perseverancia y enseñarme que es posible hacer todo lo que te propongas solo no hay que desistir.

A mis amigos “los chidos”: Edgar Amaro, Marisol Reyes, Alejandra Salazar, Melisa Prado, Ernesto Zapata, Kevin Ibarra y Valeria Rodríguez por siempre estar ahí para mí y no permitir que se apagara mi llama aún y cuando los vientos soplaron fuerte.

Mis amigos Miguel García, Ramón Rodríguez y Omar Valle por siempre poder contar con ellos en el pasado y en el presente.

Y a mi familia: Mi mamá la Q.B.P. Magda y mi hermana la L.D.I. Zehidy por apoyarme siempre en todas mis decisiones y permanecer siempre a mi lado, siempre con amor y con cariño y por enseñarme a valorar los momentos importantes en la vida.

Y a mi padre: por ser siempre el ejemplo a seguir.



# Tabla de Contenido

Capítulo.....	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cáncer de pulmón.....	1
1.2. Generalidades del cáncer de pulmón.....	2
1.3. Tratamientos para el cáncer de pulmón.....	3
1.4. Macrófagos como inmunoterapia contra el cáncer.....	5
1.5. Activación de macrófagos con proteínas de <i>Trichinella spiralis</i> .....	7
1.6. Triquinelosis.....	7
1.7. Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i> .....	8
2. Justificación.....	9
3. Hipótesis.....	10
4. Objetivos.....	11
4.1. Objetivo General.....	11
4.2. Objetivos Específicos.....	11
5. Material y Métodos.....	12
5.1. Mantenimiento del ciclo de vida del parásito.....	12
5.2. Cultivo de LM de <i>Trichinella spiralis</i> .....	12
5.3. Western Blot de ESPs.....	13
5.4. Línea celular A549.....	14
5.5. Obtención de monocitos derivados de sangre periférica.....	14
5.6. Diferenciación a macrófagos M1y M2.....	15
5.7. Ensayo de viabilidad.....	15
5.8. Ensayo de citotoxicidad.....	16
6. Resultados.....	17
6.1. Análisis de antígenos de Excreción/Secreción (AES) y Antígenos Totales (AT) de la Larva Muscular de <i>Trichinella spiralis</i> en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot (WB).....	17
6.2. Efecto de los AES en la producción de IL-12 e IL-4 en macrófagos derivados de monocitos.....	21
6.3. Evaluación del efecto citotóxico de los AT de la Larva Muscular de <i>Trichinella spiralis</i> en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.....	24
6.4. Análisis del efecto citotóxico de sobrenadante proveniente del cultivo de macrófagos estimulados con antígenos totales de <i>Trichinella spiralis</i> administrados en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.....	26
7. Discusión.....	38
8. Conclusiones.....	37
9. Referencias.....	38

## Lista de Figuras

Figura		Página
Figura 1.	Tasa de incidencia de cáncer de pulmón en México.....	2
Figura 2.	Etapas del cáncer, características y tratamientos.....	4
Figura 3.	Mecanismos de interacción entre macrófagos M1/M2 con células tumorales.....	6
Figura 4.	Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i> .....	8
Figura 5.	Cuantificación de AES y AT por el método de Bradford.....	17
Figura 6.	Antígenos Totales (AT) y de E/S (AES) de <i>Trichinella spiralis</i> en SDS-PAGE. Zhong Q. Wang et. al. 2017.....	18
Figura 7.	Antígenos de E/S y AT de <i>Trichinella spiralis</i> en gel de SDS-PAGE.....	18
Figura 8.	Western Blot de suero de pacientes con triquinelosis. (Radovic I. et. al. 2012).....	19
Figura 9.	Western Blot de Antígenos de Excreción/Secreción (AES) no dializados.....	20
Figura 10.	Western Blot de Antígenos Totales (AT).....	20
Figura 11.	Producción de Interleucinas correspondientes a cada fenotipo de macrófagos.....	21
Figura 12.	Producción de IL-12 e IL-4 por macrófagos estimulados con AES de <i>Trichinella spiralis</i> . ....	22
Figura 13.	Producción de IL-12 e IL-4 por macrófagos estimulados con diferentes concentraciones de AT de <i>T. spiralis</i> .....	24
Figura 14.	Inhibición en la proliferación de diferentes líneas celulares con varias dosis de AT de <i>Trichinella spiralis</i> . (X. L. Wang et. al. 2009).....	25
Figura 15.	Análisis de medición de LDH y degradación de MTT en células A549.....	26
Figura 16.	Detección de liberación de LDH para evaluar citotoxicidad en las células A549.....	27

## Lista de Abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
HCl	Ácido Clorhídrico
AD	Adulto
AE/S	Antígenos de Excreción/Secreción
AT	Antígenos Totales
$\beta$ -Me	Beta-Mercaptoetanol
TBS	Buffer Salino de Tris
TBS-T	Buffer Salino de Tris+Tween
CP	Cáncer de pulmón
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
CPCP	Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas
Cis-DDP	Cis-Platino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida
	DodecilSulfatodeSodio
EGF	Factor de Crecimiento Endotelial
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
M-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-4	Interleucina-4
IL-12	Interleucina-12
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LM	Larva Muscular
LRN	Larva Recién Nacida
LPS	Lipolisacárido
TAM	Macrófagos Asociado a Tumor
MDM	Macrófago derivado de monocito
DMEM	Medio Esencial Mínimo Dulbecco
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa
MR	Receptor de Manosa
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrón
WB	Western Blot

# RESUMEN

Marcos Arroyo Garza

Fecha de graduación: Diciembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título de estudio:** Evaluación de la actividad citotóxica mediada por macrófagos sensibilizados con antígenos de *Trichinella spiralis* en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón

**Número de páginas:** 45

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

**Área de estudios:** Parasitología Molecular

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. El corto tiempo de detección para este tipo de cáncer causa que la tasa de mortalidad sea muy alta y los tratamientos disponibles son muy agresivos, es por eso que se requieren nuevas terapias alternativas que eliminen sus efectos adversos. Una de estas estrategias es la inmunoterapia la cual pretende modular la respuesta inmune del paciente, para esto se requiere una inmunización con antígenos tumorales o no tumorales entre los cuales se encuentran los antígenos del parásito nematodo *Trichinella spiralis* el cual puede estimular los macrófagos asociados a tumor (M2) e inmunomodularlos hacia un fenotipo que elimine el tumor (M1).

## Conclusiones:

- Los AES no modulan a los macrófagos derivados de sangre periférica,
- Los macrófagos estimulados con 1 µg/mL de AT+GM-CSF estimulan la producción de IL-12 así como el estímulo con 2 µg/mL de AT.
- 25, 60 y 75 µg/mL de AT inhiben la proliferación de la línea A549 en un 80%.
- El sobrenadante de macrófagos estimulados con AT tienen efecto citotóxico en las células A549 a una dilución 1:2.



---

Dr. Romel Hernández Bello  
Director de Tesis

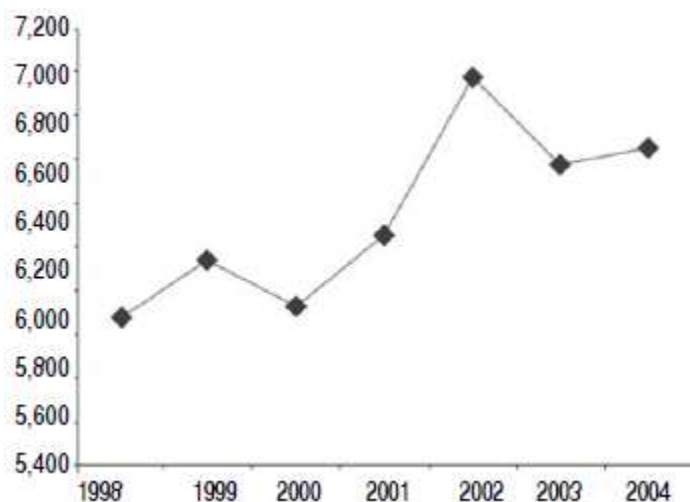
# **Capítulo 1**

## **INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Cáncer de Pulmón**

El cáncer de pulmón (CP) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con los datos publicados por GLOBOCAN hasta el 12 de Septiembre del 2018 existen a nivel mundial 2.094 millones de casos de incidencia para CP y 1.8 millones de casos de muerte para el mismo.<sup>1</sup>

En México, el CP es una de las principales causas de muerte por cáncer. Las muertes por CP en el país en el año 2018 fueron 6,733 siendo este número de defunciones aún mayor que las provocadas por otros tipos de cáncer como estómago y similar al de próstata, hígado y mama.<sup>1</sup> Se ha observado un aumento en la incidencia del CP en México a partir de 1970<sup>2</sup> destacando el periodo entre 1998 a 2004 en el cual se registraron 397,400 muertes provocadas por neoplasias de origen maligno, de las cuales el 11.5 % (45,578) fueron correspondientes a cáncer de pulmón (Figura 1)<sup>3</sup>. Debido al bajo nivel educativo y desconocimiento sobre los síntomas del cáncer de pulmón, en México se presentan personas a recibir atención en etapas donde la enfermedad ya se encuentra en un estado avanzado<sup>4-6</sup>. Según registros del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), el 1.2% de los pacientes que acuden son detectadas en etapas tempranas de la enfermedad, el 16% son detectados con enfermedad avanzada y el 82% con metástasis<sup>7</sup>



**Figura 1.** Tasa de incidencia de cáncer de pulmón en México del año 1998 al año 2004<sup>3</sup>.

## 1.2. Generalidades del Cáncer de Pulmón

Entre los principales factores de riesgo que pueden llevar al desarrollo del cáncer de pulmón se encuentran el tabaquismo pasivo y el tabaquismo activo siendo este último el de mayor relevancia ya que en México el 16% de las personas mayores de 15 años son fumadoras<sup>8</sup>. Otros factores de riesgo como la exposición a elementos como el asbesto, arsénico, níquel e hidrocarburos policíclicos aromáticos, entre otros, la predisposición genética y la contaminación del medio ambiente también pueden llevar al desarrollo del CP<sup>9</sup>.

Algunos de los signos y síntomas que presentan los pacientes con CP son; la tos persistente, hemoptisis, pérdida de peso y dolor torácico, sin embargo no se cuenta con un diagnóstico específico a partir de la sintomatología. El cáncer de pulmón, en función al tipo

de célula de donde proviene, se puede definir en: 1) Cáncer Pulmonar de Células Pequeñas (CPCP) y 2) Cáncer Pulmonar de Células No Pequeñas (CPCNP) los cuales representan el 20% y 80% de los tumores pulmonares que se diagnostican, respectivamente. Este último se subdivide a su vez en tres tipos: 2a) Carcinoma escamoso epidermoide, el cual representa el 40% de los casos de CP y es el tipo más común y de localización central. 2b) Carcinoma no escamoso de tipo adenocarcinoma el cual representa un 30% de casos de CP diagnosticados, este es de tipo periférico y puede llegar a afectar la caja torácica y pleura. Por último se encuentra el 2c) Carcinoma de células grandes el cual ocupa un 10% de tumores que se diagnostican y que, posee características distintas de los carcinomas anteriores<sup>10</sup>. En la actualidad, el Adenocarcinoma presenta un aspecto relevante ya que este ha presentado un incremento comparado con el Epidermoide siendo distinto a hace 60 años cuando el último de estos presentaba un relación en comparación con el Adenocarcinoma de 17:1<sup>11</sup>.

### **1.3. Tratamientos para el Cáncer de Pulmón**

Dependiendo de la etapa en la que se encuentre el tumor, del tipo de tumor (CPCNP o CPCP) así como del comportamiento del tumor y de las características de la persona que lo presenta, es el tipo de tratamiento que recibirá. Existen tres tratamientos: Cirugía, Radioterapia y Quimioterapia (Figura 2). Las primeras de éstas son consideradas como locales, en cambio, la quimioterapia son de tipo sistémicas ya que estas son distribuidas a través del torrente sanguíneo<sup>10</sup>.

Etapas	Características	Tratamientos
I	Tumor de 2 – 3 cm.	Cirugía y/o radioterapia
II	Tumor de 3 – 7 cm.	
III	Tumor en ganglios linfáticos	Quimioterapia y/o radioterapia
IV	Metástasis	

**Figura 2. Etapas del cáncer, características y tratamientos.**

Entre los fármacos utilizados en la quimioterapia se encuentra el cis-platino (cis-DDP) el cual inhibe la síntesis del ADN, de forma que produce enlaces cruzados dentro del mismo siendo este un proceso antineoplásico. Aunado a esto produce actividad inmunosupresora como principal efecto adverso así como trombocitopenia, anemia, náuseas, anorexia entre otros<sup>12</sup>.

Existen terapias alternativas que pretenden eliminar estos efectos adversos así como inmunomodular la respuesta inmune del paciente activando células del sistema inmune administrando antígenos de origen tumoral, tal como menciona Anagnostou V. *et. al.* (2015)<sup>13</sup> en donde la administración de una vacuna que contenga antígenos tumorales activa una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T y B, a través de la activación de las células dendríticas para que posteriormente los linfocitos T y B ejerzan un efecto citotóxico sobre las células tumorales.

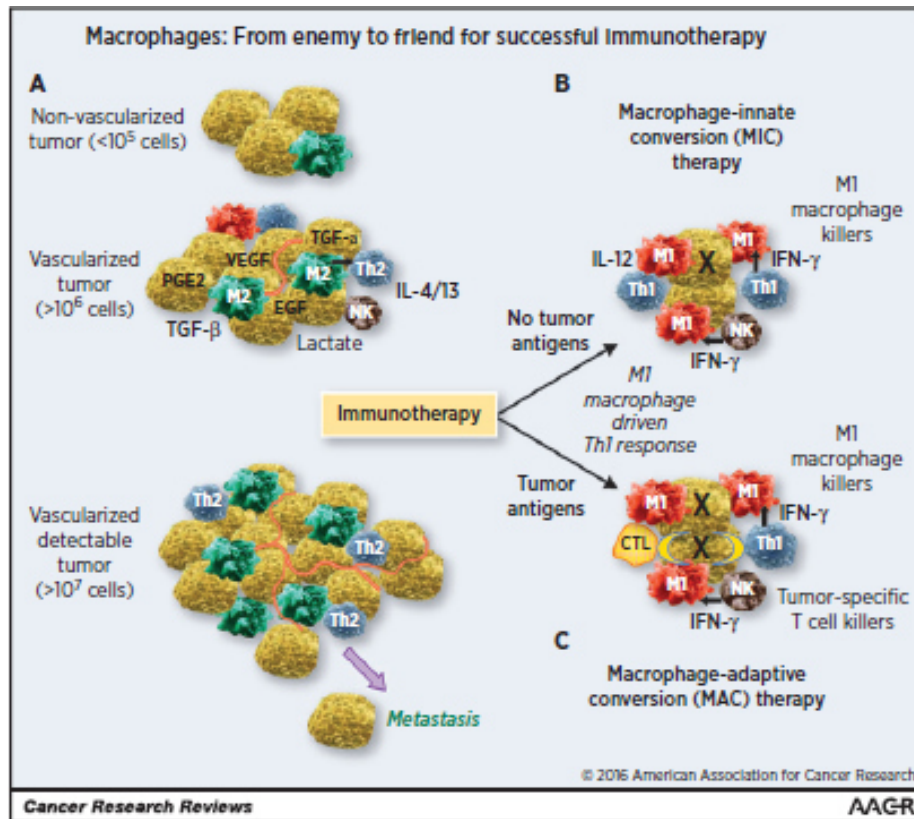


#### **1.4. Macrófagos como inmunoterapia contra el cáncer**

Uno de los factores más importantes en la respuesta inmune contra el cáncer son los macrófagos. Estos juegan un papel fundamental en la regresión o el crecimiento de los tumores.

Por ejemplo, los macrófagos con un fenotipo anti-inflamatorio o M2 predominan en el cáncer y éstos producen moléculas que promueven el crecimiento. La modulación de un fenotipo M2 hacia un fenotipo proinflamatorio M1 puede detener el crecimiento del tumor estimulando los linfocitos T citotóxicos del tipo Th1 así como otras células efectoras.<sup>14</sup>

A finales de 1980, Hibbs *et.al.* encontraron que los macrófagos eliminan células cancerosas produciendo Óxido Nítrico (NO, Nitric Oxide por sus siglas en inglés)<sup>15</sup>. Esta molécula es utilizada por los macrófagos para inhibir el crecimiento de las células tumorales utilizando la Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) así como también promueven el crecimiento de las mismas con la producción de ornitina convirtiendo la arginina vía Arginasa<sup>16,17</sup>. Los macrófagos de fenotipo proinflamatorio que inhiben el crecimiento son llamados tipo M1 en contraste de aquellos macrófagos que promueven el crecimiento que son llamados tipo M2. Estos últimos, conocidos como Macrófagos Asociados a Tumor o TAM (Tumor Associated Macrophages por sus siglas en inglés) producen factores de crecimiento como VEGF y EGF (Figura 3)<sup>18</sup>. Así mismo, estos macrófagos pueden detectar antígenos de tipo tumoral o no tumoral los cuales puedan provocar una activación en los mismos para llevar a cabo una respuesta inmune.



**Figura 3.** Mecanismos de interacción entre macrófagos M1/M2 con células tumorales.<sup>18</sup>

Vigneron N. 2015<sup>19</sup> menciona que los antígenos tumorales pueden ser de origen viral, codificados por mutaciones en los genes, por genes de la línea germinal como el Melanoma Codificado de línea Germinal (MAGE, por sus siglas en inglés), BAGE, GAGE, LAGE, antígenos con baja especificidad tumoral así como antígenos sobreexpresados de origen no tumoral, como en el caso de los parásitos helmintos, siendo el caso de los antígenos de *Trichinella spiralis*.

### **1.5. Activación de macrófagos con proteínas de *Trichinella spiralis***

*T. spiralis* es un parásito nemátodo que posee en su estructura proteínas que sufren cambios antigénicos<sup>20</sup> para evadir el sistema inmune en los diferentes estadios de desarrollo presentando proteínas glicosiladas en su estructura y productos de excreción/secreción<sup>21</sup>. Entre las proteínas de *T. spiralis* algunas poseen estructuras de manosa<sup>22</sup> que son reconocidas por el sistema inmune innato y adaptativo como los Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR por sus siglas en inglés)<sup>23</sup>. De estas moléculas, el Receptor de Manosa (MR, por sus siglas en inglés) se encuentra en la superficie de macrófagos<sup>24</sup>. Las interacciones de las proteínas de *T. spiralis* con MR activa la vía de señalización la cual produce enzimas lisosomales<sup>25</sup> y especies reactivas de oxígeno<sup>26</sup>.

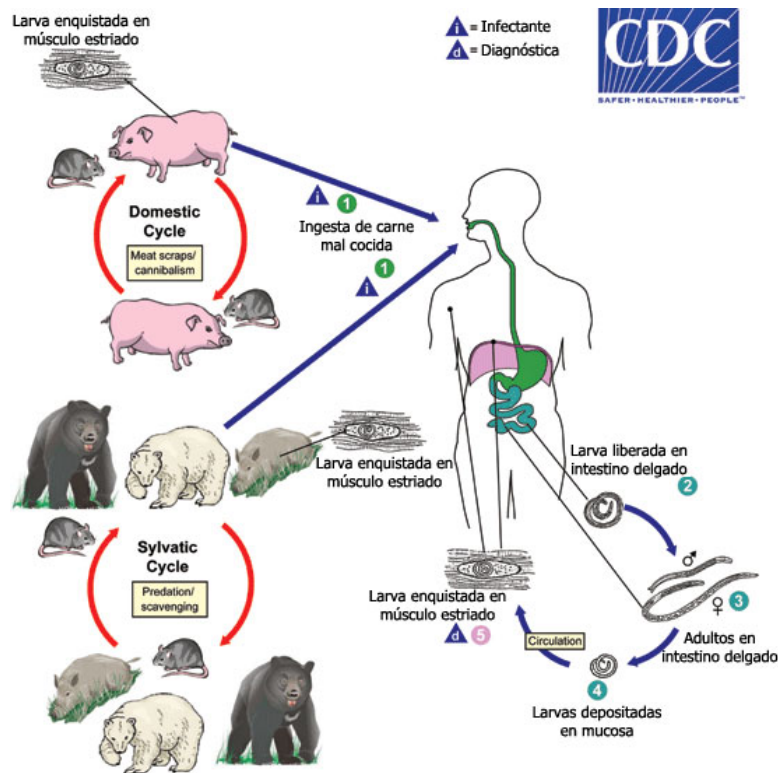
### **1.6. Triquinelosis**

La triquinelosis es la enfermedad causada por el parásito nemátodo *Trichinella spiralis* el cual es de origen zoonótico, posee una distribución cosmopolita. Debido a las costumbres alimenticias de cada país como el consumo de carne de cerdo, de caballo, de perro etc. promueven la amplia distribución del parásito.<sup>27</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en México 351 casos desde 1986-2001<sup>28</sup>. Se determinó la presencia de una triada de proteínas de 45, 48 y 53 kDa en el suero de personas que estuvieron expuestas al parásito, esto para determinar la seroprevalencia encontrándose distribuido en toda la república mexicana<sup>29</sup>.

## 1.7. Ciclo biológico de *Trichinella spiralis*

Su ciclo se divide en dos fases, una intestinal y otra muscular. En la primera de estas la Larva Muscular (LM) se deposita en los enterocitos donde se desarrolla en Adulto (AD), estos copulan y a lo largo de 36 horas desarrollan Larvas Recién Nacidas (LRN) las cuales viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar al músculo estriado esquelético, lo cual se conoce como fase muscular, en donde se desarrollan en LM durante 20 días para después formar una célula nodriza y mantener encapsulada la LM, pasando desapercibido por el sistema inmune (Figura 4)<sup>30</sup>.



**Figura 4.** Ciclo biológico de *Trichinella spiralis*. Ciclo salvaje y doméstico en donde se indica la LM como fase infectiva (1), liberación de las mismas en el intestino (2) y maduración y reproducción en fase de AD (3,4). Por último (5) migración de LRN al músculo.

## Capítulo 2

### 2. Justificación

Por todo lo anterior en este trabajo se propone la siguiente justificación. El cáncer de pulmón tiene una alta incidencia de mortalidad en la población mundial. Los tratamientos más comúnmente utilizados como el cis-platino generan efectos adversos en el paciente y tienen costos muy elevados. Por ello, el estudio de nuevas estrategias como la inmunoterapia en donde los macrófagos son una herramienta para el tratamiento contra el cáncer se vuelve atractivo.

En este proyecto se pretende estudiar el efecto de los antígenos de *T. spiralis* en el fenotipo de macrófagos co-cultivados con una línea celular de adenocarcinoma de pulmón.

## Capítulo 3

### 3. Hipótesis

Los antígenos de *Trichinella spiralis* sensibilizarán macrófagos hacia un fenotipo M1 los cuales tendrán un efecto citotóxico en las células de adenocarcinoma de pulmón.

## Capítulo 4

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica de macrófagos sensibilizados con proteínas de la larva muscular del parásito nematodo *Trichinella spiralis* en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549).

#### 4.2. Objetivos Específicos

- 1.- Obtener Antígenos Totales (AT) y de Excreción/Secreción (E/S) de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.
- 2.- Evaluar el efecto *in vitro* de los Antígenos Totales (AT) y de Excreción/Secreción (E/S) de *T. spiralis* en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549) y en macrófagos derivados de sangre periférica.
- 3.- Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de macrófagos sensibilizados con Antígenos Totales (AT) de *T. spiralis* en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A549).

## Capítulo 5

### 5. Material y Métodos

#### 5.1. Mantenimiento del ciclo de vida del parásito

Se utilizó la cepa CHN°2 de *Trichinella spiralis*. La cepa se mantuvo en ratones de la cepa BALB/c los cuales fueron infectados con 500 LM y después de 40 días de infección se sacrificaron por dislocación cervical para obtener la carcasa de estos ratones infectados. Posteriormente se realizó una digestión artificial empleando pepsina (Sigma) al 1% y HCl (Merck) al 1% incubándose a 37°C durante 3 horas en agitación constante. Terminado el tiempo, se filtraron las larvas a través de una gasa y se dejó sedimentar por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y las larvas se lavaron con solución salina al 0.85% hasta eliminar cualquier residuo de la solución de digestión<sup>31</sup>.

#### 5.2. Cultivo de LM de *Trichinella spiralis*

Las larvas musculares obtenidas fueron lavadas repetidas veces utilizando PBS con Streptomycin/Ampicilina (Sigma) al 1%, posteriormente se cultivaron 5,000 a 6,000 LM en cajas Petri utilizando medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Sigma) suplementado con Ampicilina/Estreptomycin al 1%. La caja Petri fue puesta a incubación con 37°C por 24 y 48 horas. El sobrenadante obtenido, que contiene las proteínas de Excreción/Secreción (E/S) fue centrifugado a 12,000g a 4°C por 30



min y precipitado utilizando el método de Metanol-Cloroformo para ser dializadas posteriormente<sup>32</sup>.

Los Antígenos Totales fueron obtenidos tras la disrupción mecánica de las larvas musculares, esto llevado a cabo en frío y posteriormente centrifugado a 20,000g por 10 min usando una pastilla con inhibidor de proteasas. Después de esto las proteínas fueron dializadas en frío contra agua destilada durante dos días en agitación, se cuantificó su concentración mediante método de Bradford y fueron utilizadas en un gel de SDS-PAGE.

### **5.3. Western Blot de ESPs**

Las proteínas fueron resuspendidas en amortiguador Tris-P (10mM Tris-HCl pH 8.13 con inhibidores de proteasas 50 µg ml<sup>-1</sup> l-1-tosilamida-2-feniletilclorometil cetona, 25 µg ml<sup>-1</sup> N-α-p-tosil-1-lisine-clorometil-cetona-HCl, 1 mM fenilmetil sulfonil fluoruro y 2% desoxicolato de sodio).

Posteriormente fueron cuantificadas por el método de Bradford (BioRad). Se utilizaron 30 µg de las proteínas las cuales fueron hervidas a 95°C por 5 minutos en amortiguador de Laemmli conteniendo β-mercaptoetanol (β-ME) y se cargaron en geles de SDS-PAGE al 10%.

Las proteínas se separaron electroforéticamente, fueron transferidas a una membrana de PVDF y se bloquearon con amortiguador TBS-T (20 mM Tris [tris(hidroximetil) aminometano], 150 mM NaCl-0.05% Tween 20 (v/v), pH 7.5 y 5% (w/v) de leche

descremada en polvo (Svelty, Nestlé) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y se lavaron 3 veces con TBS-T por 5 min cada uno.

Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario obtenido del suero de ratón infectado con *Trichinella spiralis* en una dilución 1:5000 en amortiguador TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (TA), se lavó 3 veces con TBS-T (5 min c/u) y en seguida se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:7500 durante 1 hora a TA.

Para la detección de la señal se usaron reactivos para quimioluminiscencia de BioRad y placas radiográficas marca Kodak. La estimación del peso molecular de la proteína de interés se realizó por comparación con marcadores de peso molecular estándar (Dual color plus, BioRad).

#### **5.4. Línea celular A549**

La línea celular de Adenocarcinoma de pulmón fue mantenida utilizando el medio de cultivo F12-k de Dubelcco el cual fue suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y Ampicilina/Streptomicina al 1%.

#### **5.5. Obtención de monocitos derivados de sangre periférica**

Se obtuvieron aproximadamente 20 mL de sangre de personas sanas y a esta se le administró Histopaque (Pancoll human) y fue centrifugada a 400g a 4°C por 30 minutos. Posteriormente fueron

aisladas utilizando perlas magnéticas CD14<sup>+</sup> de MACsystem, se determinó un porcentaje de viabilidad mayor al 90% y fueron cultivados en cajas de 96 pozos con medio RPMI-1640 suplementado con antibiótico a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 días.

## **5.6. Diferenciación a macrófagos M1y M2**

A estos macrófagos Mø se les administró 1 µg/mL de los AT de *Trichinella spiralis*. Por otra parte, a otros macrófagos se les diferenció al fenotipo M1 administrando 25 ng/mL de GM-CSF por 6 días para su pre-diferenciación y posterior a esto se les administró 40 ng/mL de IFN-γ y 200 ng/mL de LPS.

Correspondiente a los macrófagos M2, se les administró 25 ng/mL de M-CSF por 6 días para su pre-diferenciación, después se les administró 20 ng/mL de M-CSF y 40 ng/mL de IL-4.

## **5.7. Ensayo de viabilidad**

Después de 72 horas de haber administrado el tratamiento se les administró 20 µg/mL del reactivo MTT a las células de la línea A549 que fueron sometidas a tratamiento con los AT, AES, cisplatino y sobrenadante de macrófagos estimulados con proteínas o diferenciados a los diferentes fenotipos para después de 1 hora realizar una lectura a 490 nm.

## 5.8. Ensayo de citotoxicidad

Después de 72 horas de haber administrado el tratamientos se administró 50 µL de la mezcla de reacción que provee el kit a cada pozo que fue tratado con AT, AES, cis-platino y sobrenadante de macrófagos estimulados con proteínas o diferenciados a los diferentes fenotipos durante 30 minutos para después agregar 50 µL de la enzima LDH y posterior a los 30 minutos agregar la reacción de paro para ser leído a 595 nm. Esa absorbancia fue convertida a porcentaje de citotoxicidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{Compound-treated LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous LDH activity}} \times 100$$

## Capítulo 6

### 6. Resultados

#### 6.1. Análisis de antígenos de Excreción/Secreción (AES) y Antígenos Totales (AT) de la Larva Muscular de *Trichinella spiralis* en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot (WB)

Los Antígenos de Excreción/Secreción (AES) y los Antígenos Totales (AT) de la Larva Muscular (LM) de *Trichinella spiralis* se obtuvieron de cultivo y de digestión artificial respectivamente. En ambos casos, los antígenos se dializaron contra agua destilada y se les realizó una cuantificación por el método de Bradford (Figura 5) y posteriormente para verificar su integridad se separaron en un gel de poliacrilamida. En el gel se observó que las proteínas después de la diálisis estaban integras, además de un patrón de bandeo similar al reportado por Shao *et. al.* (2014)<sup>33</sup> para ambos tipos de Antígenos (Figura 6 y 7).

Antígenos de E/S	
24 horas	[1.34µg/mL]
48 horas	[3.47µg/mL]

Antígenos Totales	
20,000 LM	[696µg/mL]

Figura 5. Cuantificación de AES y AT por el método de Bradford.

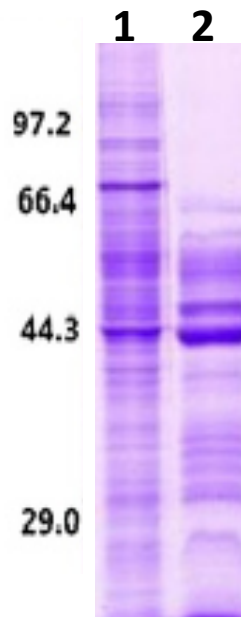


Figura 6. Antígenos Totales (AT) y de E/S (AES) de *Trichinella spiralis* en gel de Poliacrilamida. Carril 1 (AT) y 2 AES. Shao R. L. Zhong Q. Wang et. al. 2014.

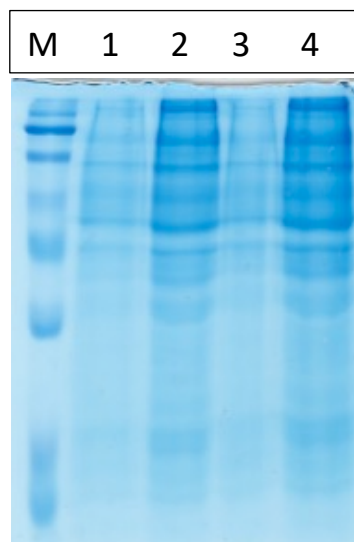


Figura 7. Antígenos de E/S y AT de *Trichinella spiralis* en gel de Poliacrilamida. Marcador de peso molecular (M). Carril 1 y 3 AES no dializados y dializados respectivamente; carriles 2 y 4 AT no dializados y dializados respectivamente.

Posteriormente el gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de PVDF para realizar WB empleando un anticuerpo primario policlonal obtenido del suero de ratones infectados por un mes con la LM (Figura 9 y 10). En estudios previos se han realizado análisis de WB empleando los Antígenos de Excreción/Secreción (AES) y Antígenos Totales (AT) de *T. spiralis* con sueros de pacientes infectados con este parásito; encontrándose la misma triada característica en los AES y AT de la LM en donde se aprecian las bandas de 45 kDa, 49 kDa y 53 kDa (Figura 8). Nuestros resultados muestran un patrón similar al reportado por Radovic I. (2012)<sup>34</sup>, en donde se aprecia la triada de proteínas reconocidas por el anticuerpo policlonal de suero de ratón probado en AES obtenidos de cultivo de LM (Figura 9). Este mismo patrón se pudo encontrar en los AT obtenidos por disrupción de las LM en el cual se muestra este mismo patrón de proteínas características así como otras proteínas que conforman la estructura de la larva (Figura 10).

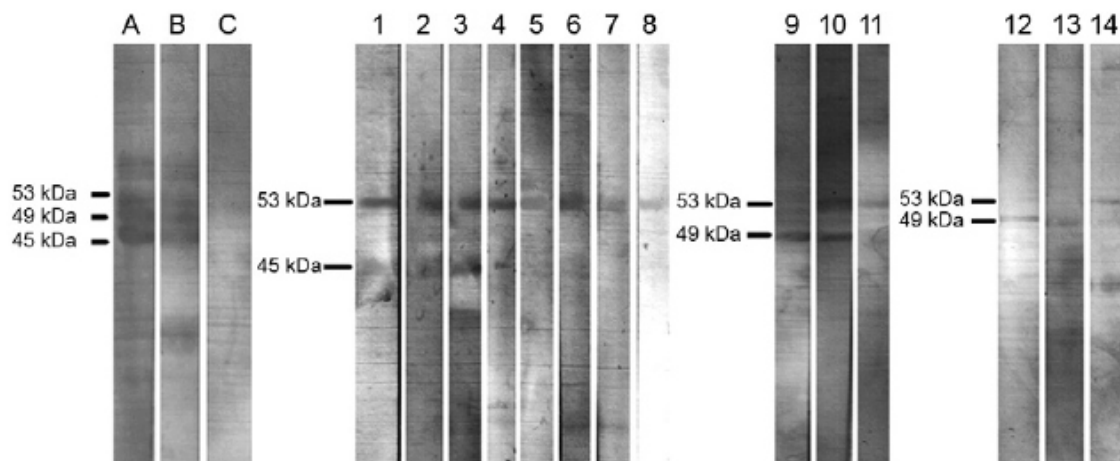


Figura 8. WB donde se muestra la triada característica que reconoce el suero de pacientes con triquinelosis. (Radovic I. et. al. 2012).

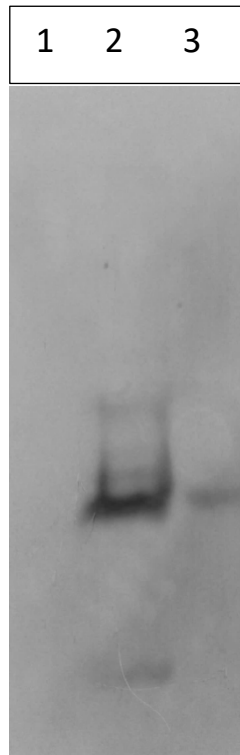


Figura 9. Western Blot de Antígenos de Excreción/Secreción (AES). Carril 1 control Negativo. Carriles 2 y 3 AES no dializados.

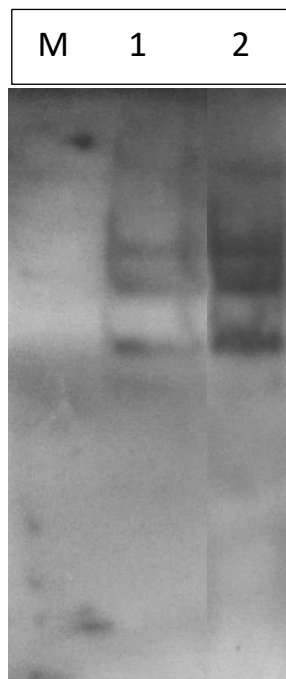


Figura 10. Western Blot de Antígenos Totales (AT). Marcador de peso molecular (M). Carriles 1 (dializados) y 2 (no dializados).



## 6.2. Efecto de los AES en la producción de IL-12 e IL-4 en macrófagos derivados de monocitos

En primera instancia nos enfocamos en el efecto de los AES en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Para determinar si los AES polarizan los macrófagos ( $M\phi$ ), es decir, aquellos que aún no tienen un *priming* en su fenotipo hacia M1 o M2, se determinó la producción de Interleucinas (IL) -12 e IL-4.

García González *et. al.* (2017)<sup>35</sup> diferenció macrófagos hacia un fenotipo M1 y M2 utilizando el Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y el Factor Estimulante de Colonia de Monocitos (M-CSF, por sus siglas en inglés) los cuales polarizan los macrófagos hacia un perfil M1 y M2, respectivamente. Posterior a esto se midió la producción de IL-12 e IL-4 los cuales son marcadores para los fenotipos anteriormente mencionados, respectivamente (Figura 11).

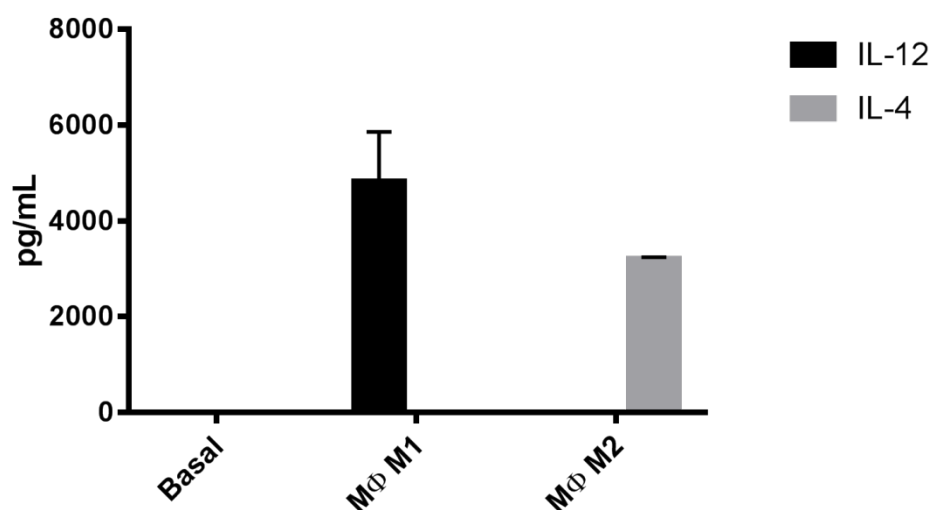


Figura 11. Producción de Interleucinas correspondientes a cada fenotipo de macrófagos.

Para ello se obtuvo sangre periférica de personas sanas posterior a esto se mezcla con Histopaque y se purifican mediante columnas con perlas magnéticas CD14+, estos monocitos son cuantificados para viabilidad mediante azul tripan y cultivados.

Los Antígenos de Excreción/Secreción (AES) se utilizaron para estimular monocitos y así poder analizar su perfil de polarización, esto se llevó a cabo midiendo la producción de IL-12 el cual es un marcador para macrófagos M1 e IL-4 como marcador para macrófagos M2 (Figura 12) empleando una dosis de 1  $\mu\text{g/mL}$  de AES y posteriormente analizados por ELISA.

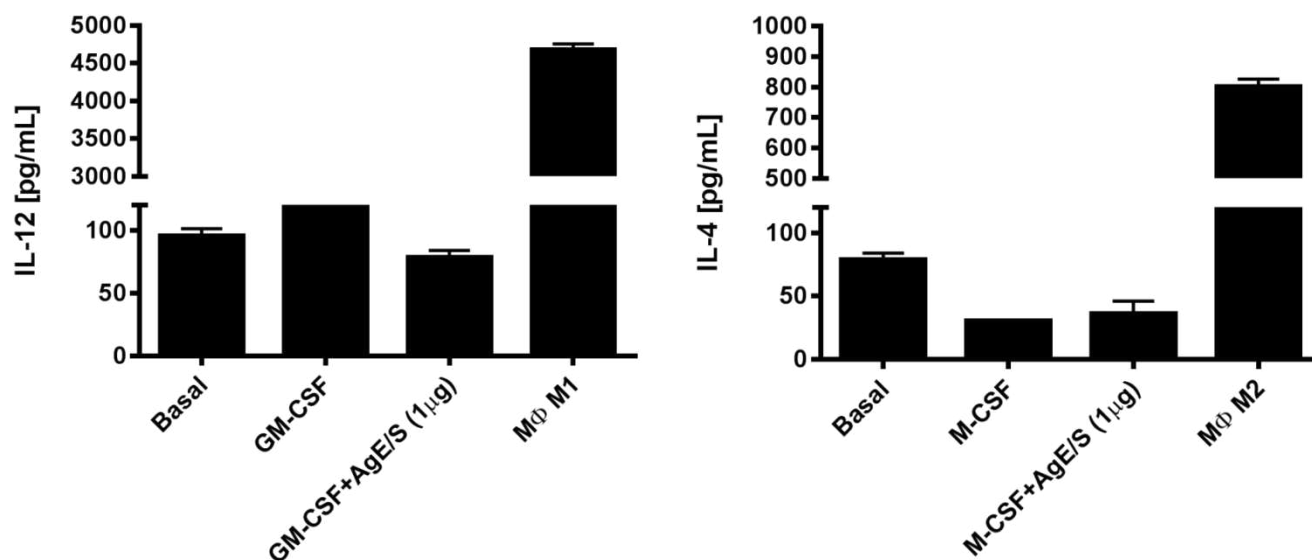


Figura 12. Producción de IL-12 e IL-4 por macrófagos estimulados con AES de *Trichinella spiralis*.

Debido a que los AES de *Trichinella spiralis* no generaron un efecto en los macrófagos en cuanto a la producción de interleucinas, se decidió probar el efecto de los Antígenos Totales (AT) de *Trichinella spiralis* para averiguar si estos producían algún efecto en la polarización de los macrófagos (Figura 13). Cuando los macrófagos estuvieron en presencia de los AT, se pudo observar un incremento en la producción de IL-12 la cual corresponde al perfil de macrófagos M1, esta Interleucina se encontró presente en una mayor cantidad que la IL-4, la cual corresponde al fenotipo M2, mostrando así un perfil del tipo proinflamatorio principalmente.

Estos ensayos se realizaron utilizando 1 µg/mL de proteína de Antígenos Totales (AT) con el Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF) y por separado con el Factor Estimulante de Colonia de Monocitos (M-CSF) ya que polarizan los macrófagos hacía un perfil M1 y M2, respectivamente. Se decidió evaluar esta misma producción de Interleucinas utilizando el doble de cantidad de proteína (2 µg/mL) para verificar o descartar que estas interleucinas siguieran produciéndose por los macrófagos. Al utilizar solamente la proteína sin ningún factor estimulante se observó un incremento en la producción de IL-12 mayor que en la estimulación con 1 µg/mL de proteína total, ya sea administrando solamente la proteína o en conjunto con el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF).

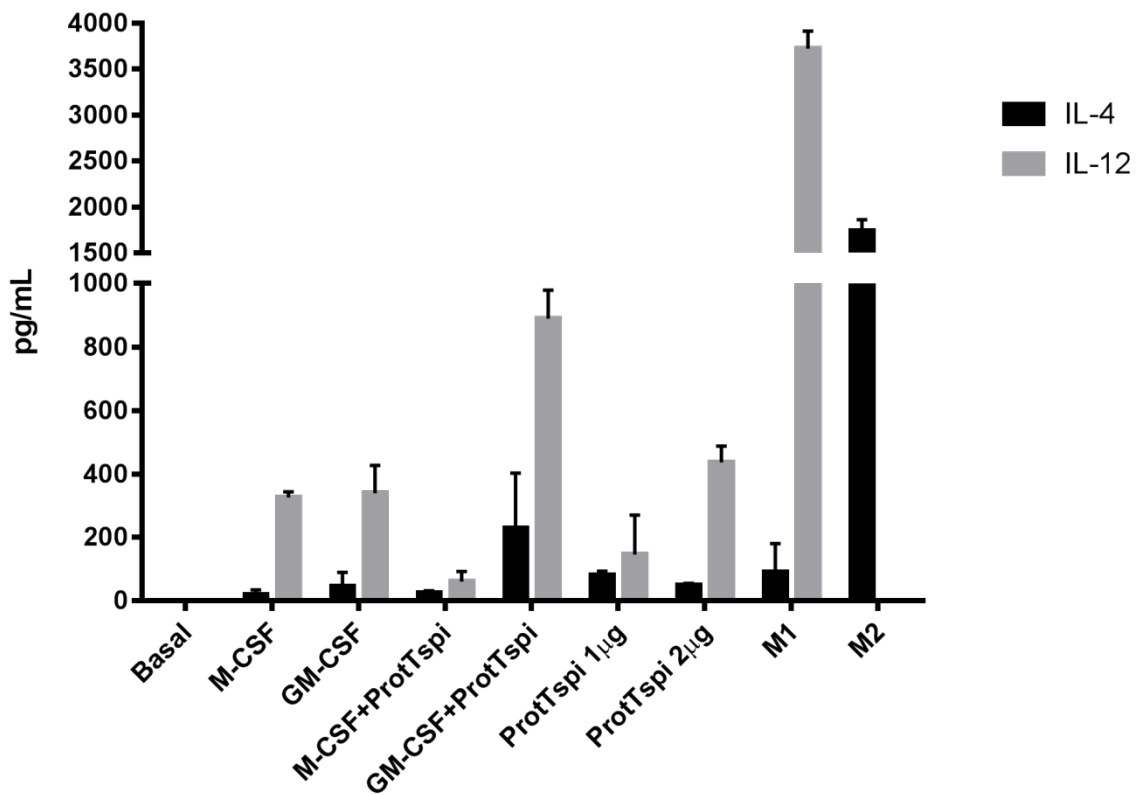


Figura 13. Producción de IL-12 e IL-4 por macrófagos estimulados con diferentes concentraciones de antígenos totales de *T. spiralis*.

### 6.3. Evaluación del efecto citotóxico de los AT de la Larva Muscular de *Trichinella spiralis* en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549

En la literatura, se ha reportado que los AT tienen un efecto directo deletéreo en las líneas celulares MFC (Cáncer de estómago murino), H22 (Hepatoma ascítico murino), S180 (Sarcoma murino), K562 (Leucemia mieloide crónica humana) y H7402 (Hepatoma humano) administrando hasta 0.140 mg/mL de Antígenos Totales (Figura 14). Estos AT administrados directamente sobre el cultivo a diferentes concentraciones muestran una inhibición en la

proliferación de las células, además muestran que hay una relación dosis-dependiente.

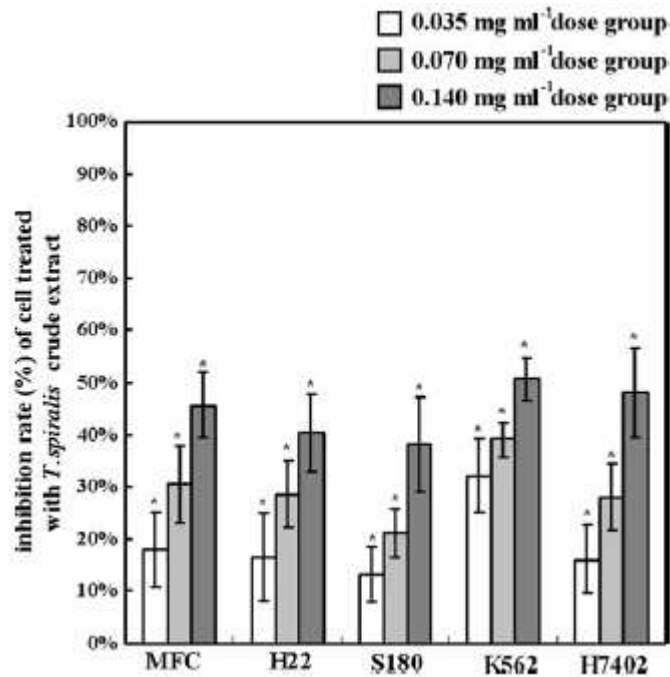


Figura 14. Inhibición en la proliferación de diferentes líneas celulares con varias dosis de AT de *Trichinella spiralis*. (X. L. Wang et. al. 2009).

Con la finalidad de determinar si los AT de *T. spiralis* generaban un efecto citotóxico como reporta X.L. Wang (2009)<sup>36</sup>, se probaron los AT de *T. spiralis* en diferentes dosis sobre el cultivo de las células A549 por 72 horas. La citotoxicidad generada en las células se determinó mediante la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH), un indicativo de muerte por necrosis. También, se midió la viabilidad celular para luego analizar el efecto que presentaban mediante la medición de LDH así como la medición de la degradación del reactivo MTT hacia formazan usando MTT (Figura 15). La concentración más alta de antígenos totales (75 µg/mL) fue la que presentó un mayor efecto citotóxico.

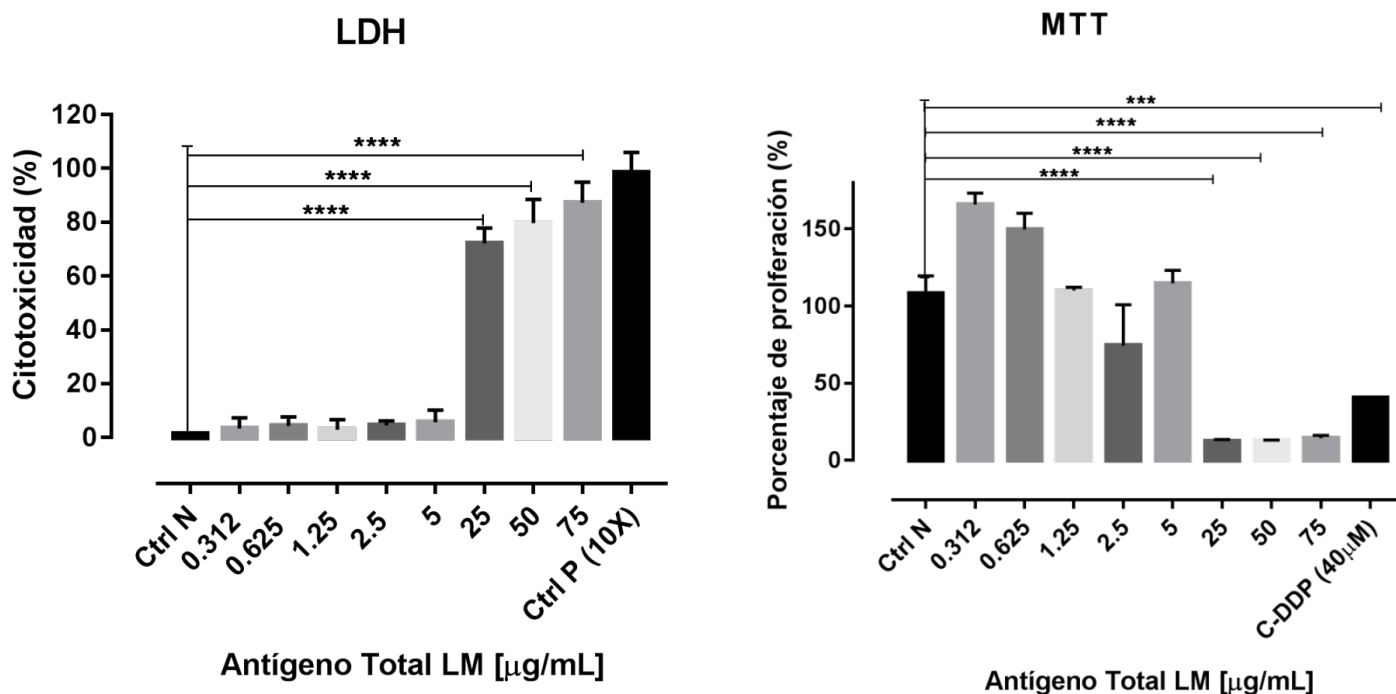


Figura 15. Análisis de medición de LDH y degradación de MTS en 9 diferentes concentraciones.

#### 6.4. Análisis del efecto citotóxico de sobrenadante proveniente del cultivo de macrófagos estimulados con antígenos totales de *Trichinella spiralis* administrados en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549

Los antígenos totales de la LM de *T. spiralis* fueron administrados en 1  $\mu\text{g/mL}$  al cultivo de monocitos obtenidos de sangre periférica después de 9 días estos sobrenadantes se administraron a las células A549 por 72 horas y se realizó el ensayo de LDH y MTT para evaluar un efecto citotóxico en las mismas. Se observó que el sobrenadante de los macrófagos diferenciados al fenotipo M1 tuvo un efecto negativo para las células, así mismo, la administración del

sobrenadante de los macrófagos estimulados con los AT tuvo un efecto en la liberación de LDH sobre las células A549 en la menor de las diluciones (Figura 16).

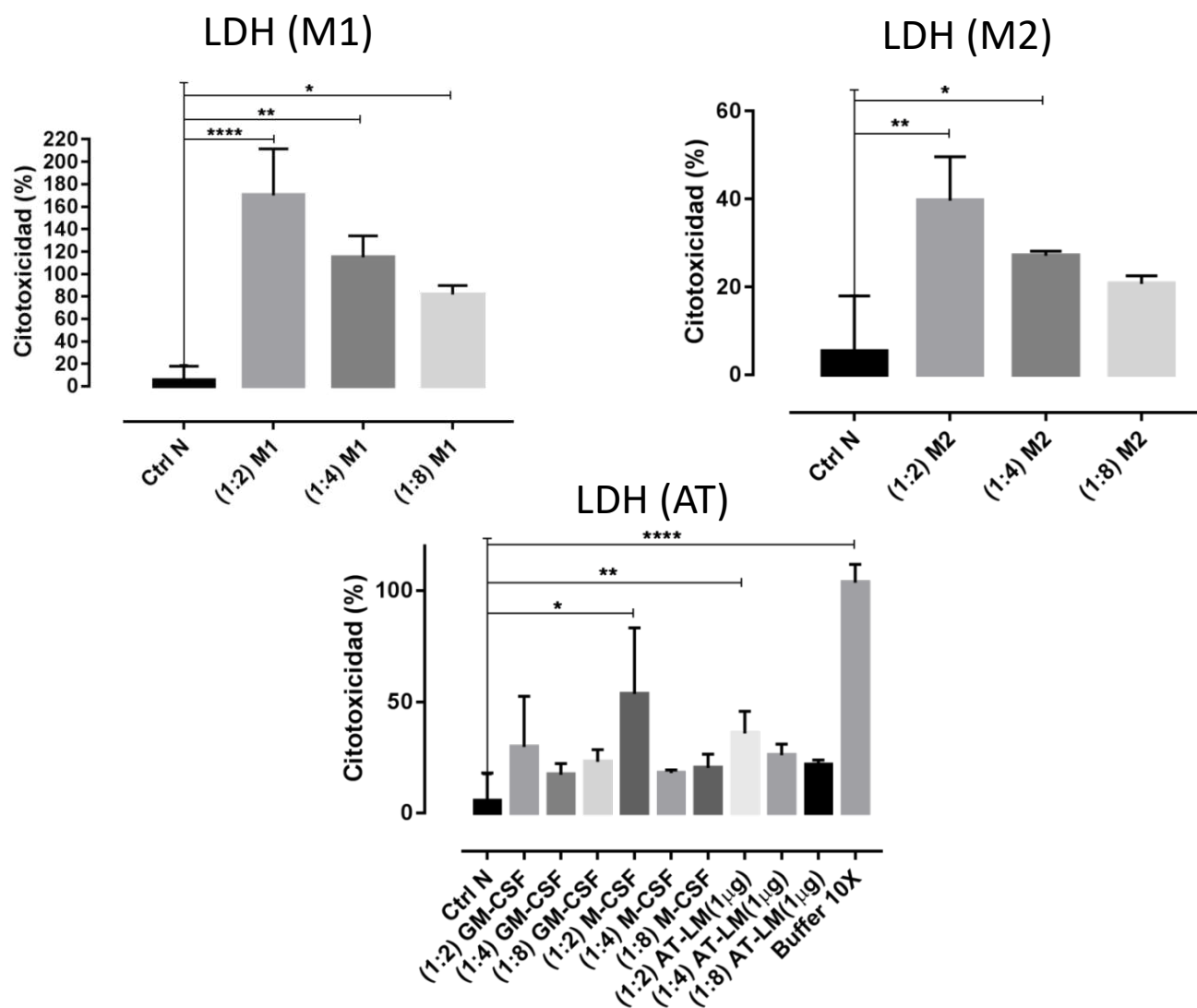


Figura 16. Método de detección de liberación de LDH para evaluar citotoxicidad en las células A549.

## Capítulo 7

### 7. Discusión

El cáncer de pulmón (CP) es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. De acuerdo con los datos publicados por GLOBOCAN hasta el 12 de Septiembre del 2018 existen a nivel mundial 2.094 millones de casos de incidencia para CP y 1.8 millones de casos de muerte para el mismo<sup>1</sup>.

Existen tres tratamientos para el CP: Cirugía, Radioterapia y Quimioterapia. Las primeras de estas son consideradas como locales; en cambio, la quimioterapia es de tipo sistémica ya que esta es distribuida a través del torrente sanguíneo. Entre los fármacos utilizados en la quimioterapia se encuentra el cis-platino el cual inhibe la síntesis del ADN de forma que produce enlaces cruzados dentro del mismo siendo este un proceso antineoplásico. Aunado a esto, el cis-platino genera una actividad inmunosupresora como principal efecto adverso así como trombocitopenia, anemia, náuseas, anorexia entre otros, lo que se traduce en un decaimiento en la calidad de vida del paciente.

Una terapia alternativa que promueve la eliminación de estos efectos secundarios es la inmunoterapia la cual pretende modular la respuesta inmune de macrófagos hacia un perfil pro-inflamatorio o M1.

Los macrófagos juegan un papel importante en la regresión o el crecimiento de los tumores, más específicamente, los macrófagos con un fenotipo antiinflamatorio o M2, los cuales predominan en



los tumores y producen moléculas que promueven el crecimiento del mismo. Se sabe que células tumorales para escapar de la inmunovigilancia, pueden reducir sus proteínas antigénicas, expresar receptores que inhiben la respuesta de los linfocitos T o incluso generar un perfil anti-inflamatorio o M2 en los macrófagos M1. De hecho, en estudios realizados por Müller U. C. *et. al.* (2012)<sup>37</sup> se observó que las células de adenocarcinoma de pulmón A549 al estar en co-cultivo con macrófagos derivados de monocito, son capaces de inducir una expresión de CCL18 el cual es un marcador para macrófagos M2, así mismo, estas células en co-cultivo generan una producción de CXCL10 el cual es un marcador para macrófagos M1. En este sentido, la modulación de un fenotipo anti-inflamatorio M2 hacía un fenotipo pro-inflamatorio M1 o viceversa puede ser cuantificada mediante la medición de estas quimiocinas u otras moléculas producidas por cada perfil de estos macrófagos.

Entre las proteínas que pueden generar un perfil pro-inflamatorio o M1 en los macrófagos Mø, son las mismas proteínas tumorales, las cuales se utilizan en algunos tratamientos de inmunomodulación, sin embargo también se propone el uso de proteínas no tumorales que induzcan un perfil M1. Dentro de este tipo de proteínas se encuentran las proteínas de helmintos como las de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

*Trichinella spiralis* es un parásito nemátodo el cual posee en su estructura proteínas las cuales sufren cambios antigénicos a manera de evasión del sistema inmune en los diferentes estadíos de su desarrollo presentando proteína glicosiladas en su estructura así como productos de excreción/secreción. Entre las proteínas de

*Trichinella spiralis* algunas poseen estructuras de manosa las cuales son reconocidas por el sistema inmune innato y adaptativo siendo reconocidos específicamente por los Receptores de Reconocimiento de Patrón (PRR por sus siglas en inglés). De estas moléculas, el Receptor de Manosa (MR, por sus siglas en inglés) se encuentra en la superficie de los macrófagos.

El parásito nemátodo *Trichinella spiralis* posee antígenos de Excreción/Secreción los cuales utiliza para llevar a cabo su ciclo biológico. Es el estadio de Larva Muscular el que se encuentra mayor tiempo en el hospedero y autores como Teppema *et. al.* (1973) y; Despomier (1993)<sup>38</sup> han estudiado su desarrollo en el hospedero y mencionan que durante este proceso la célula muscular desarrolla varios cambios antes de convertirse en célula nodriza. Así mismo, se ha observado que los antígenos de Excreción/Secreción así como los Antígenos Totales poseen una capacidad inmunomoduladora.

Existen reportes donde se han utilizado ambos antígenos de *Trichinella spiralis* para estimular macrófagos a medida de evaluar su inmunomodulación, tal es el caso de Gruden *et. al.* (2005)<sup>39</sup> donde se pudo observar la producción de NO (Óxido Nítrico, por sus siglas en inglés) el cual es un marcador para el perfil de macrófagos M1. Al utilizar 100 µg/mL para estimularlos pudieron observar la producción de 20 µM de NO, esto en macrófagos peritoneales de ratón. Se decidió evaluar la activación de macrófagos mediante la cuantificación de la producción de IL-12 e IL-4 los cuales son marcadores para el perfil M1 y M2, respectivamente, siendo esto evaluado en macrófagos diferenciados de monocitos derivados de sangre periférica.

Como referencia se tiene la tesis de maestría de González G *et. al.* (2017)<sup>35</sup> en donde se evaluó la producción de estas interleucinas en macrófagos derivados de monocitos. Esta misma cuantificación fue realizada encontrando cantidades de 4700 pg/mL de IL-12 y 800 pg/mL de IL-4 como controles positivos y el control basal expresó una producción de 100 pg/mL y 70 pg/mL respectivamente.

Por todo lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto que producen los AT y los ES de la LM en macrófagos Mø y en las células de adenocarcinoma de pulmón A549, así como el efecto citotóxico que generan macrófagos sensibilizados con estas proteínas en las células A549.

Nuestros resultados obtenidos para ambos tipos concuerdan con los reportados por Shao R. L. *et. al.* (2014)<sup>33</sup>. Estos mismos antígenos se han utilizado en Western Blot en donde se observa la triada característica de *T. spiralis* reconocida por los anticuerpos de personas que han estado infectadas con triquinelosis (Radovic I. *et. al.* 2012)<sup>34</sup>. Así mismo, pudimos observar esta misma triada en el Western Blot realizado a los antígenos de Excreción/Secreción así como a los Antígenos Totales, como se mencionó anteriormente en los resultados. Al sensibilizar los macrófagos con 1 µg/mL de los antígenos de Excreción/Secreción junto con el Factor Estimulante de Colonia de Monocito (M-CSF) y Factor Estimulante de Colonia de Granulocito y Monocito (GM-CSF) no se observó una activación ya que la cantidad producida de IL-12 en macrófagos estimulados con E/S+M-CSF fue de 20 pg/mL y de 80 pg/mL para E/S+GM-CSF siendo menor que el control basal.

También se evaluó la producción de IL-4 en macrófagos sensibilizados con E/S+M-CSF y E/S+GM-CSF y tampoco se observó una activación ya que la cantidad de IL-4 producida fue de 30 pg/mL y 50 pg/mL respectivamente, siendo también menor que la cantidad producida por el control basal.

Reading P.C. *et. al.* (2000)<sup>40</sup> mencionan que los macrófagos detectan los antígenos mediante receptores como el Receptor de Manosa y se ha demostrado que estos antígenos pueden competir para unirse al receptor, esto podría explicar de cierta medida el hecho de que se hayan detectado niveles de IL-12 e IL-4 menores a los basales ya que no se les realizó un tratamiento previo antes de sensibilizar a los macrófagos.

Caso contrario sucedió con los Antígenos Totales. Al administrar 1 µg/mL de AT+M-CSF no se observó una diferencia significativa en la producción de IL-12 en comparación con el control basal, sin embargo, al utilizar 1 µg/mL de AT+GM-CSF se produjo una cantidad de 1000 pg/mL de IL-12 siendo mayor que los 100 pg/mL del basal. Al evaluar si la administración de solamente los AT a los macrófagos presentaban algún efecto de sensibilización se observó una producción de IL-12 de 400 pg/mL la cual también es mayor a la producida por el control basal.

Estos resultados nos indican que la administración de AT tiende a provocar una respuesta en los macrófagos de liberación de IL-12 más que de IL-4. Xiaojing M. *et. al.* (2015)<sup>41</sup> mencionan que la IL-12 se produce por células presentadoras de antígenos activadas por patógenos como los macrófagos y células dendríticas, presenta una naturaleza del tipo pro-inflamatoria y tiene funciones activadoras

para células NK así como induce la diferenciación de linfocitos TCD4+ vírgenes para convertirse en células T cooperadoras productoras de IFN- $\gamma$ . Por tanto la cuantificación de esta interleucina puede ser utilizada como medida de activación, Grohmann U. *et. al.* (2001)<sup>42</sup> reporta una cantidad de 25 pg/mL de IL-12 en sobrenadante cuantificado por método de ELISA en macrófagos no estimulados siendo menor a la que nosotros reportamos utilizando el mismo método.

Existen antecedentes donde estos Antígenos Totales se han administrado directamente sobre cultivos de células tumorales y se observa un efecto de inhibición en la proliferación. Tal es el caso de Wang X. L. *et. al.* (2009)<sup>43</sup> en donde utilizaron concentraciones de 35, 70 y 140  $\mu$ g/mL de AT y observaron que la inhibición de la proliferación era dependiente de la dosis yendo del 20%, 30% al 50% respectivamente esto evaluado en línea celulares de carcinoma de estómago murino, hepatoma ascítico, sarcoma murino, leucemia mieloide crónica humana y hepatoma humano.

En este proyecto se decidió evaluar este mismo efecto en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 utilizando dosis de 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 25, 50 y 75  $\mu$ g/mL de AT mediante el método de MTT el cual se basa en la degradación del reactivo mediante enzimas mitocondriales. Como control positivo de citotoxicidad de utilizó el cis-platino para el cual existen reportes (Barr N. *et. al.* 2013)<sup>44</sup> donde se exhibe un efecto dañino para las células de la línea A549 a partir de una concentración de 10  $\mu$ M. Al utilizar el cis-platino sobre el cultivo observamos que a una concentración de 40  $\mu$ M presentaba un porcentaje de inhibición de la proliferación del 60% mientras que las últimas tres

concentraciones de AT exhibieron una mayor inhibición en el porcentaje de proliferación de la línea A549 siendo del 80% para las 3 concentraciones. Boonmars T. *et. al.* (2004)<sup>45</sup> mencionan que durante la formación de la célula nodriza de *Trichinella spiralis* la diferenciación de la célula muscular así como su diferenciación, proliferación y apoptosis están regulados por factores que involucran a la mitocondria y demuestran que el proceso de inhibición en la proliferación de algunas de las líneas celulares que utilizaron está asociado al daño a la mitocondria y apoptosis aunque se desconoce el mecanismo exacto.

También se evaluó la liberación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en esta misma línea celular utilizando las mismas concentraciones de AT. La Lactato Deshidrogenasa se ha utilizado como marcador para apoptosis en evaluaciones como la realizada por Uchide N. *et. al.* (2009)<sup>46</sup> donde mencionan que la liberación de la enzima está relacionada con el daño en la estructura de las células y su posterior muerte. Decker T. *et. al.* (1988)<sup>47</sup> afirman que la enzima es citosólica y se libera cuando ocurre un daño en la membrana plasmática, al liberarse al medio esta convierte el lactato en piruvato reduciendo el  $\text{NAD}^+$  a NADH para después ser utilizado por la diaforasa para reducir la sal de tetrasolio (INT) en rojo formazán y esta coloración es directamente proporcional a la liberación de LDH.

Esta liberación de LDH se interpreta como % de citotoxicidad provocado por la administración de los AT. No se sabe el mecanismo exacto por el que los antígenos causan daño a las células pero se ha visto que tienen un efecto dosis-pendiente. Las concentraciones que provocaron una alta liberación de LDH fueron

las de 25, 50 y 75 µg/mL teniendo un porcentaje de citotoxicidad del 75, 80 y 85 % respectivamente. No existen reportes de cuantificación de liberación de LDH utilizando antígenos de *Trichinella spiralis*, sin embargo, Danielsen P. H. *et. al.* (2008)<sup>48</sup> utilizaron este método en la misma línea celular administrando partículas de contaminación del aire en concentraciones de 25, 100 y 250 µg/mL y observaron un efecto dosis dependiente siendo el porcentaje de liberación de LDH mayor al 40% a partir de las últimas dos concentraciones.

Al utilizar los sobrenadantes de macrófagos estimulados con 1 µg/mL de AT así como diferenciados hacia un perfil M1 se pudo observar un porcentaje de citotoxicidad del 40% y del 100%, respectivamente, este porcentaje disminuye a medida que se realiza una dilución del sobrenadante con medio de cultivo F12-K. Taniguchi H. *et. al.* (2010)<sup>49</sup> utilizaron macrófagos diferenciados hacia un perfil M1 de la línea NR883 la cual son macrófagos alveolares de ratón en co-cultivo con células de la línea A549 y observaron un efecto de muerte sobre estas últimas. Ellos mencionan que el contacto célula-célula causa el efecto de muerte.

También observaron que al administrar el sobrenadante de los macrófagos de la línea NR8383 sobre la línea A549 durante 3 días se podía apreciar un efecto de inhibición en la proliferación de la misma. Menciona que el sobrenadante de macrófagos diferenciados hacia un perfil M1 contiene moléculas como TNF-α, IL-1β y óxido nítrico. TNF-α posee efectos inhibitorios en células tumorales, indica Horssen R. *et. al.* (2006)<sup>50</sup>, la IL-1β está involucrada en partes importantes de la respuesta inmune y reacciones inflamatorias, así como posee funciones antitumorales,

comenta Dinarello C. A. (1988)<sup>51</sup>. Así mismo, se sabe que el óxido nítrico es un mediador que posee funciones relacionadas a lesiones e inflamaciones así como induce la apoptosis de las células tumorales, afirma Schmidt H. H. *et. al.* (1994)<sup>52</sup> y Sveinbjornsson B. *et. al.* (1996)<sup>53</sup>.

Por último, Beckman J. S. *et. al.* (1996)<sup>54</sup> menciona que el óxido nítrico al reaccionar con el radical superóxido genera peroxinitrito y este último, comenta MacMicking J. *et. al.* (1997)<sup>55</sup> posee una fuerte actividad citotóxica.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por los autores anteriormente mencionados, puede que los macrófagos estén teniendo el mismo efecto sobre los cultivos de la línea A549 a través de la secreción de moléculas en su sobrenadante. Por tanto, queda como perspectiva realizar las cuantificaciones de las mismas moléculas en el sobrenadante de macrófagos para evaluar su efecto citotóxico sobre el cultivo.



## Capítulo 8

### 8. Conclusiones

Los antígenos de Excreción/Secreción (AES) no modularon a los macrófagos derivados de sangre periférica,

Los macrófagos estimulados con 1  $\mu\text{g/mL}$  de Antígenos Total (AT) en conjunto con GM-CSF estimularon la producción de IL-12 así como el estímulo solamente con 2  $\mu\text{g/mL}$  de proteína diferenciándose a un perfil de macrófagos M1.

Los Antígenos Totales (AT) administrados a una concentración de 25, 60 y 75  $\mu\text{g/mL}$  inhibieron la proliferación de la línea A549 en un 80%, en comparación al cis-platino el cual inhibió la proliferación en un 60% a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ .

El sobrenadante de macrófagos estimulados con AT presentó un efecto citotóxico cuando se puso en contacto con las células A549 a una dilución 1:2.

## 9. Referencias

1. International Agency for Research on Cancer (2018) GLOBOCAN. <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>
2. Lazcano-Ponce EC, Tovar-Guzmán V, Meneses-González F, Rascón-Pacheco RA, Hernández-Ávila M. Trends of lung cancer mortality in Mexico. Arch Med Res 1997; 28: 565-70.
3. Ruiz-Godoy L, Rizo-Ríos P, Sánchez-Cervantes F, Osornio-Vargas A, García-Cuellar C, Meneses-García A. Mortality due to lung cancer in Mexico. Lung Cancer 2007; 58:184-90.
4. Franco-Marina F, Villalba-Caloca J. La epidemia de cáncer pulmonar en México. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2001; 14(4):207-14.
5. Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarría JG, Rebora FT. Primary lung cancer in Mexico City: A report of 1019 cases. Lung Cancer 1996; 14(2-3): 185-93.
6. Medina MF, Salazar FM, García Sancho MC, Franco MF. Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, 1997-2000. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2002; 3: 149-52.
7. Arrieta O, Campos-Parra AD, Zuloaga Z, Avilés A, Sánchez- Reyes R, Vázquez MME, Covián-Molina E, et al. Clinical and pathological characteristics, outcome and mutational profiles regarding non-small-cell lung cancer related to wood-smoke exposure. J Thorac Oncol 2012; 7(8): 1228-34.

8. Encuesta Nacional de adicciones. Disponible en [http://www.conadics.salud.gob.mx/pdfs/ena08/ENA08\\_NACIONAL.pdf](http://www.conadics.salud.gob.mx/pdfs/ena08/ENA08_NACIONAL.pdf)
9. Beelen R, Hoek G, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Fischer P, Schouten LJ, et al. Long-term exposure to traffic-related air pollution and lung cancer risk. *Epidemiology* 2008; 19(5): 702-10.
10. Cáncer de pulmón. Guía para pacientes y familiares. 2014. Primera Edición. Madrid, España
11. Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med* 1997; 26(4): 427-34.
12. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. *Pediamécum*. Edición 2015. Cisplatino. Disponible en: <http://www.pediamecum.es>. Consultado en 04-07-2018.
13. Valsamo K. Anagnostou and Julie R. Brahmer. Cancer Immunotherapy: A Future Paradigm Shift in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*; 21(5) March 1, 2015.
14. Mills Charles D. Lenz Laurel L. Harris Robert A. A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Research* 2016;76:513-516.
15. Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987;138:550–65.
16. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: oracles of health and disease. *Crit Rev Immunol* 2012;32:463–88.

17. Mills CD. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 2001;21:399–425.
18. Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol* 2015;6:212.
19. Nathalie Vigneron. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2015, Article ID 948501, 17 pages.
20. Maizels, R.M., Bundy, D.A.P., Selkirk, M.E., Smith, R.M., Anderson, R.M., 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365, 797–805.
21. Gruden-Movsesijan, A., Ilic', N., Sofronic'-Milosavljevic', Lj., 2002. Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory–secretory components. *Parasitol. Res.* 88, 1004–1007.
22. Appleton, J., Dell, A., Nitz, M., Bundle, D., 2001. Novel N-Glycans of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 13, 481–492.
23. Medzhitov, R., Janeway Jr., C., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9.
24. Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J., Schlesinger, P.H., 1978. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1399–1403.
25. Lefkowitz, D.L., Lincoln, J.A., Lefkowitz, S.S., Bollen, A., Moguilevsky, N., 1997. Enhancement of macrophage-mediated

bactericidal activity by macrophage mannose receptor–ligand interaction. Immunol. Cell. Biol. 75, 136–141.

26. Murray, H.W., 1990. Effects of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. 161, 992–994.

27. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):127-45, Table of Contents.

28. Murrell KD, Pozio E. Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986-2009. Emerg Infect Dis. 2011 Dec;17(12):2194-202.

29. Martínez-Barbabosa I, Quiroz MG, Romero-Cabello R, Presas AMF, Tsuji OV, León MJP, et. al. Inmunoepidemiología de la triquinelosis. Rev Mex Patol Clin. 2000;47(3):156-61.

30. Marco Antonio Becerril Flores. Parasitología Médica. 4<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill;2014.

31. Dennis DT. Despommier DD. Davis N. Infectivity of the Newborn Larva of *Trichinella spiralis* in the Rat. J Parasitol. 1970 Oct;56(5):974.

32. Luo J. Yu L. Xie G. Li D. Su M. Zhao X. Du L. Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by *Trichinella spiralis* muscle larvae ESPs. Parasitology. 1-8:2017.

33. Shao Rong Long, Zhong Quan Wang, Ruo Dan Liu, Li Na Liu, Ling Ge Li, Peng Jiang, Xi Zhang, Zi Fang Zhang, Hai Ning Shi and Jing

Cui1. Molecular identification of *Trichinella spiralis* nudix hydrolase and its induced protective immunity against trichinellosis in BALB/c mice. Long et al. *Parasites & Vectors* 2014, 7:600.

34. Ivana Radovic, Alisa Gruden-Movsesijan, Natasa Ilic, Marija Mostarica-Stojkovic, Ljiljana Sofronic-Milosavljevic. *Trichinella spiralis* shares epitopes with human autoantigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 107(4): 503-509, June 2012.

35. García González Gerardo. Participación de los receptores activados por proteasas en la polarización de macrófagos M1/M2 y su efecto sobre la respuesta Th1 en un modelos *in vitro* de activación con CFP de *Mycobacterium tuberculosis*. *FacMed UANL*. 2017.

36. X.L. Wang, B.Q. Fu, S.J. Yang, X.P. Wu, G.Z. Cui, M.F. Liu, Y. Zhao, Y.L. Yu, X.Y. Liu, H.K. Deng, Q.J. Chen, M.Y. Liu. *Trichinella spiralis*—A potential anti-tumor agent. *Veterinary Parasitology* 159 (2009) 249–252.

37. Ulrike Carolin M, Iler-Quernheim, Lars Potthast, Joachim M Iler-Quernheim, and Gernot Zissel. Tumor-Cell Co-Culture Induced Alternative Activation of Macrophages Is Modulated by Interferons In Vitro. *JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH* Volume 32, Number 4, 2012.

38. Teppema, J.S., Robinson, J.E., Ruitenberg, E.J., 1973. Ultrastructural aspects of capsule formation in *Trichinella spiralis* infection in the rat. *Parasitology* 66, 291–296.

39. A. Gruden-Movsesijan, Lj. Sofronic Milosavljevic. The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate

immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109 (2006) 57–67.

40. Patrick C. Reading,<sup>†</sup> Joanna L. Miller, E. Margot Anders. Involvement of the Mannose Receptor in Infection of Macrophages by Influenza Virus. *Journal of Virology*, June 2000, p. 5190–5197,

41. Ma X, Yan W, Zheng H et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells [version 1; referees: 3 approved] *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):1465.

42. Ursula Grohmann, Maria L. Belladonna, Carmine Vacca, Roberta Bianchi, Francesca Fallarino, Ciriana Orabona, Maria C. Fioretti, and Paolo Puccetti. Positive Regulatory Role of IL-12 in Macrophages and Modulation by IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 2001; 167:221-227.

43. X.L. Wang, B.Q. Fu, S.J. Yang, X.P. Wu, G.Z. Cui, M.F. Liu, Y. Zhao, Y.L. Yu, X.Y. Liu, H.K. Deng, Q.J. Chen, M.Y. Liu. *Trichinella spiralis*—A potential anti-tumor agent. *Veterinary Parasitology* 159 (2009) 249–252.

44. Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, et al. (2013) Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. *PLoS ONE* 8(1): e54193.

45. T. Boonmars, Z. Wu, I. Nagano, T. Nakada and Y. Takahashi. Differences and similarities of nurse cells in cysts of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Journal of Helminthology* (2004) 78, 7–16.

46. Uchide N, Ohyama K, Bessho T, Toyoda H. Lactate dehydrogenase leakage as a marker for apoptotic cell degradation induced by influenza virus infection in human fetal membrane cells. *Intervirology*. 2009;52(3):164-73.
47. Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Meth* 115:61-9.
48. Pernille Høgh Danielsen, Steffen Loft and Peter Møller. DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. *Particle and Fibre Toxicology* 2008, 5:6.
49. Hiroaki Taniguchi, Yasuteru Shimada, Keiichi Sawachi, Keiji Hirota, Hiroyuki Inagawa, Chie Kohchi, Gen-Ichiro Soma, Kimiko Makiano and Hiroshi Terada. Lipopolysaccharide-activated Alveolar Macrophages Having Cytotoxicity toward Lung Tumor Cells through Cell-to-Cell Binding-dependent Mechanism. *ANTICANCER RESEARCH* 30: 3159-3166 (2010).
50. Remco van Horssen, Timo L. M. ten Hagen, Alexander M. M. Eggermont. TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* 2006;11:397–408.
51. Dinarello CA: Biology of interleukin 1. *FASEB J* 2: 108-115, 1988.
52. Schmidt HH and Walter U: NO at work. *Cell* 78: 919-925, 1994.



53. Sveinbjornsson B, Olsen R, Seternes OM and Seljelid R: Macrophage cytotoxicity against murine meth A sarcoma involves nitric oxide-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 643-649, 1996.
54. Beckman JS, Chen J, Crow JP and Ye YZ: Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res* 103: 371-380, 1994.
55. MacMicking J, Xie QW and Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350, 1997.